

(JP Patent No. 2589618)

MAGNETICALLY RESPONSIVE FLUORESCENT POLYMER PARTICLES AND APPLICATION THEREOF

Patent number: JP4503968T

Publication date: 1992-07-16

Inventor:

Applicant:

Classification:

- international: C08F2/44; C08F8/00; C12Q1/68; G01N33/536;
G01N33/543; G01N33/553

- european:

Application number: JP19900502801 19901212

Priority number(s): US19890451274 19891214; US19890451483 19891214;
US19890451494 19891214; US19890452099 19891214

Also published as:



WO9109141 (A)
EP0463144 (A1)
JP9028397 (A)
EP0463144 (A4)
EP0463144 (B1)

Report a data error here

Abstract not available for JP4503968T

Abstract of corresponding document: **WO9109141** -

This invention provides a novel process of producing magnetically responsive fluorescent polymer particles comprising polymeric core particles coated evenly with a layer of polymer containing magnetically responsive metal oxide. A wide variety of polymeric particles with sizes ranging from 1 to 100 microns can be used as core particles and transformed into magnetically responsive polymer particles. The surface of these magnetically responsive polymer particles can be coated further with another layer of functionalized polymer. These magnetically responsive fluorescent polymer particles can be used for passive or covalent coupling of biological material such as antigens, antibodies, enzymes or DNA/RNA hybridization and used as solid phase for various types of immunoassays, DNA/RNA hybridization probes assays, affinity purification, cell separation and other medical, diagnostic, and industrial applications.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2589618号

(45) 発行日 平成9年(1997)3月12日

(24) 登録日 平成8年(1996)12月5日

(51) Int.Cl. ^a	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 F 2/44 8/00	M C S		C 0 8 F 2/44 8/00	M C S

請求項の数18(全 14 頁)

(21) 出願番号	特願平3-502801	(73) 特許権者	999999999 デイド、インターナショナル、インコーポレイテッド アメリカ合衆国60015イリノイ、ディヤフィールド、ディヤフィールドロード1717
(86) (22) 出願日	平成2年(1990)12月12日	(72) 発明者	ワン、チャオフェイ、ジェー アメリカ合衆国60031、イリノイ、ガーニー、フォックスレーン5040
(65) 公表番号	特表平4-503968	(72) 発明者	シャー、ダイネシュ、オー アメリカ合衆国60061、イリノイ、パーノンヒルズ、アレクサンドリアドライブ235
(43) 公表日	平成4年(1992)7月16日	(74) 代理人	弁理士 赤岡 逸夫 (外1名)
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 0 / 0 7 3 6 9	審査官	松井 佳章
(87) 国際公開番号	W O 9 1 / 0 9 1 4 1		
(87) 国際公開日	平成3年(1991)6月27日		
(31) 優先権主張番号	4 5 1 , 2 7 4		
(32) 優先日	1989年12月14日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
(31) 優先権主張番号	4 5 1 , 4 8 3		
(32) 優先日	1989年12月14日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
(31) 優先権主張番号	4 5 1 , 4 9 4		
(32) 優先日	1989年12月14日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 磁気応答性蛍光ポリマー粒子及びその利用

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】均一なサイズ分布と磁性含量とを有する単分散性の蛍光磁性粒子であって、

(a) モノマーを吸着し得る内側蛍光コアポリマー粒子と磁気応答性金属酸化物及びポリマーの組合せからなる被覆層とからなり、該被覆層ポリマーは前記内側コアポリマー粒子に吸着され得るモノマーを前記内側コアポリマー粒子表面上で重合したポリマーよりなるものであり、

(b) 前記金属酸化物及びポリマーの組合せは前記内側コア粒子を均一に被覆しており、そして、

(c) 前記磁性粒子が、均一なサイズ分布と均一な磁性含量とを有し溶液中で単分散性のものであることを特徴とする粒子。

【請求項2】該内側蛍光コアポリマー粒子が蛍光染料を

2

組み込んだポリスチレン又は架橋ポリスチレンよりなるものである、請求項1に記載の粒子。

【請求項3】前記磁性応答性金属酸化物及びポリマーの組合せに係るポリマーが、ポリスチレン、架橋ポリスチレン又は官能基を有するポリスチレンよりなる群より選ばれるものである、請求項1に記載の粒子。

【請求項4】均一なサイズ分布と磁性含量とを有する単分散性の蛍光磁性粒子であって、

(a) モノマーを吸着し得る内側蛍光コアポリマー粒子と磁気応答性金属酸化物及びポリマーの組合せからなる被覆層とからなり、該被覆層ポリマーは前記内側コアポリマー粒子に吸着され得るモノマーを前記内側コアポリマー粒子表面上で重合したポリマーよりなるものであり、

(b) 前記金属酸化物及びポリマーの組合せは前記内側コア粒子を均一に被覆しており、

3

(c) 前記磁気応答性金属酸化物及びポリマーの組合せからなる被覆層を被覆する外側ポリマーを有し、そして
(d) 前記磁性粒子が、均一なサイズ分布と均一な磁性含量とを有し溶液中で単分散性のものであることを特徴とする粒子。

【請求項 5】前記蛍光コアポリマー粒子が蛍光染料を組み込んだポリスチレン、架橋ポリスチレン又は官能基を有するポリスチレンよりなるものである、請求項 4 に記載の粒子。

【請求項 6】前記磁気応答性金属酸化物及びポリマーの組合せに係るポリマーが、ポリスチレン、架橋ポリスチレン又は官能基を有するポリスチレンよりなる群より選ばれるものである、請求項 4 に記載の粒子。

【請求項 7】均一なサイズ分布と磁性含量とを有する単分散性の蛍光磁性粒子であって、

(a) モノマーを吸着し得る内側蛍光コアポリマー粒子と磁気応答性金属酸化物及びポリマーの組合せからなる被覆層とからなり、該被覆層ポリマーは前記内側コアポリマー粒子に吸着され得るモノマーを前記内側コアポリマー粒子表面上で重合したポリマーよりなるものであり、

(b) 前記金属酸化物及びポリマーの組合せは前記内側コア粒子を均一に被覆しており、

(c) 前記磁気応答性金属酸化物及びポリマーの組合せよりなる被覆層を被覆する外側ポリマーを有し、

(d) 前記外側ポリマー被覆を覆う官能基を有するポリマー層を有し、そして、

(e) 前記磁性粒子が、均一なサイズ分布と均一な磁性含量とを有し溶液中で単分散性のものであることを特徴とする粒子。

【請求項 8】前記蛍光コアポリマー粒子が、蛍光染料を組み込んだポリスチレン又は架橋ポリスチレンよりなるものである、請求項 7 に記載の粒子。

【請求項 9】前記官能基を有するポリマーが、生物学的材料と結合するためのカルボキシル、アミノ又はヒドロキシル官能基を提供する物質群より選ばれるものである、請求項 7 に記載の粒子。

【請求項 10】均一なサイズ分布と磁性含量とを有する単分散性の蛍光磁性粒子であって、

(a) モノマーを吸着し得る内側蛍光コアポリマー粒子と磁気応答性金属酸化物及びポリマーの組合せからなる被覆層とからなり、該被覆層ポリマーは前記内側コアポリマー粒子に吸着され得るモノマーを前記内側コアポリマー粒子表面上で重合したポリマーよりなるものであり、

(b) 前記金属酸化物とポリマーとの組合せは前記内側コア粒子を均一に被覆しており、そして、

(c) 前記金属酸化物及びポリマーの組合せよりなる被覆層を覆う官能基を有するポリマーの層を有し、前記磁性粒子が均一なサイズ分布と均一な磁性含量を有し溶液中で単分散性のものであることを特徴とする粒子。

4

【請求項 11】前記蛍光コアポリマー粒子が蛍光染料を組み込んだポリスチレン又は架橋ポリスチレンよりなるものである、請求項 10 に記載の粒子。

【請求項 12】均一なサイズ分布と磁性含量とを有する単分散性の蛍光磁性粒子であって、

(a) モノマーを吸着し得る内側コアポリマー粒子と、
(b) 磁気応答性金属酸化物及びポリマーの組合せからなる被覆層とからなり、該被覆層ポリマーは前記内側コアポリマー粒子に吸着され得るモノマーを前記内側コアポリマー粒子表面上で重合したポリマーであって蛍光染料又は蛍光染料の組合せを含有しており、

(c) 前記金属酸化物及びポリマーの組合せは前記内側コア粒子を均一に被覆しており、

(d) 前記磁性粒子が、均一なサイズ分布と均一な磁性含量とを有し溶液中で単分散性のものであることを特徴とする粒子。

【請求項 13】均一なサイズ分布と磁性含量とを有する単分散性の蛍光磁性粒子の製造方法であって、

(a) 蛍光コアポリマー粒子を磁気応答性金属酸化物及びポリマーの組合せで均一に被覆することにより、

(b) 前記被覆ポリマーが前記内側コアポリマー粒子に吸着され得るモノマーを前記コアポリマー表面上で重合したものであることを特徴とする方法。

【請求項 14】前記磁気応答性金属酸化物が、超磁性、常磁性又は強磁性金属酸化物よりなる群より選ばれるものである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】前記磁気応答性金属酸化物及びポリマーの組合せに係るポリマーが、ポリスチレン、架橋ポリスチレン又は官能基を有するポリスチレンよりなる群より選ばれるものである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】均一なサイズ分布と磁性含量とを有する単分散性の蛍光磁性粒子の製造方法であって、

(a) コアポリマー粒子を、磁気応答性金属酸化物と、前記内側コアポリマー粒子に吸着し得るモノマーと、蛍光染料又は蛍光染料の組合せを含有する混合物を前記コアポリマー粒子表面上で重合して均一に被覆し、そして、

(b) 前記磁気応答性金属酸化物を含むポリマー層の外側をポリマーで被覆することによりなる方法。

【請求項 17】前記外側のポリマー被覆が、ポリスチレン、架橋ポリスチレン又は官能基を有するポリスチレンよりなる群より選ばれるものである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】均一なサイズ分布と磁性含量とを有する単分散性の蛍光磁性粒子の製造方法であって、

(a) 蛍光コアポリマー粒子を、磁気応答性金属酸化物と、前記内側コアポリマー粒子に吸着し得るモノマーとの混合物を前記コアポリマー粒子表面上で重合して均一に被覆し、そして、

(b) 前記磁気応答性金属酸化物を含むポリマー層の外

側をポリマーで被覆することによる方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、磁気応答性蛍光ポリマー粒子に関する。

発明の背景

本発明は、1987年10月26日に提出された米国出願番号第113294号の一部継続である。

イムノアッセイ、アフィニティー精製等のような多くの生物学的技術においては、遊離の画分から結合した画分を分離する必要がある。磁性粒子が所望の分離を促進するために使用されてきた。

磁性粒子は、種々の工程を用いて種々の粒子状の磁性体から作られており、様々な特徴を有する。例えば、イクダ等の米国特許第582622号にはゼラチン、水溶性多糖類、リン酸ナトリウム及び強磁性体物質よりなる磁性粒子が開示されており、米国特許第4628037号及び第4554088号にはポリマー性シランの被膜に囲まれた磁性金属酸化物コアよりなる磁性粒子が開示されており、米国特許第4452773号には水溶性多糖類又は官能基を有するその誘導体で被覆された強磁性酸化鉄 (Fe_3O_4) のコアを有する離散コロイドサイズの粒子が開示されており、そしてMansfieldの米国特許第4297337号には粒子状担体としての磁性ガラス又は結晶含有材料が開示されている。

発明の概要

本発明は、磁気応答性蛍光ポリマー粒子（以下、磁性蛍光粒子という）を、形状および組成に関りなく直径で約1乃至100 μm の平均サイズを有する蛍光ポリマー性粒子から製造する新規の方法を提供する。本発明の磁性粒子は、平均サイズ約1 μm 以下の磁気応答性金属酸化物（以下、金属酸化物という）を先ず製造し、次いで蛍光ポリマー性コア粒子を金属酸化物を含有するポリマー層で被覆することによって調製することができる。これらの磁性粒子の表面は、所望の表面特性を与えるために、ポリマー又は官能基を有するポリマーよりなる別の層で更に被覆することができる。

これらの磁性粒子のスペクトル特性は、単一の蛍光染料又は数種の蛍光染料の組合せになる、種々の蛍光染料を組み込んだコア粒子を使用することにより変化させることができる。別に、本発明の磁性粒子は、モノマーに可溶で且つ非蛍光ポリマー性コア粒子、金属酸化物及びモノマーの存在下にて重合条件に耐えることができる単一の蛍光染料又は数種の染料の組合せになる、種々の蛍光染料を組み込むことによって調製することができる。

本発明により製造される磁性粒子はサイズにおいて単分散性であり、粗い表面を有し、そして5%乃至50%、好ましくは10%乃至25%の磁性金属酸化物含量を有する。これらの磁性粒子の蛍光強度は、金属酸化物による陰影を変化させるために磁性金属酸化物含量を変えることにより、及び/又は蛍光ポリマーコア粒子に組

み込む蛍光染料の量を変えることにより、調整することができる。

これらの特徴を有する粒子は、イムノアッセイ及び広範な種類の生物医学的用途に有用であることが見い出されている。これらの磁性粒子は、抗原、抗体、酵素又はDNA/RNAのような生物学的材料の受動的又は共有結合による結合に使用することができ、また種々のタイプのイムノアッセイ、DNA/RNAハイブリダゼーションアッセイ、アフィニティー精製、細胞分離、食作用及び他の生物医学的用途のための固相として使用することができる。生物学的材料を結合した又は結合していないこれらの磁性粒子は、ウェル中に正しい数の粒子が放出されていることを確認するための、及びアッセイ中における粒子の損失をチェックするためのマーカーとして働かされるために、種々のアッセイ用の非磁性粒子に対して種々の比率で組み込むことができる。

目的及び利点

本発明の目的は次の通りである。

直ちに入手し得るポリマー粒子より磁気応答性蛍光ポリマー粒子を容易に製造する方法を開発すること。

中等度の沈降と速い磁気分離を有する磁気応答性蛍光ポリマー粒子の製造方法を開発すること。

生物学的材料を受動的吸着又は共有結合により結合させるための種々の表面電荷と官能基を有する磁気応答性蛍光ポリマー粒子の製造方法を開発すること。

これらの磁気応答性蛍光ポリマー粒子を用いた医学的、生物学的、診断的及び産業的用途を開発すること。

本発明の利点は次のものを含む。

約1乃至100 μm のサイズの広範な種類の蛍光ポリマーコア粒子を容易に磁気応答性粒子に変えることができる。

用途に応じて金属酸化物の含量を変化させることができる。

共有結合のために表面を誘導体化して種々の官能基を導入することができる。

得られるポリマーに種々の表面特性を与えるために、種々のモノマーを最終的な被覆に用いることができる。

架橋された又は架橋されていない磁気応答性蛍光ポリマー粒子のいずれをも製造することができる。

単分散性の磁気応答性蛍光ポリマー粒子を製造することができる。

発明の詳細な記述

本発明の磁性粒子は、先ず約1 μm 以下の平均サイズの金属酸化物を製造することにより調製することができる。金属酸化物は、2価又は3価の金属塩の混合物、好ましくは第1鉄及び第2鉄の硫酸塩又は塩化物と水酸化ナトリウム溶液との混合物を加熱し沈澱させることにより製造する。金属酸化物の所望のサイズ及び磁性特性を得るためには、2価の金属塩の3価の金属塩に対するモル比は0.5乃至2.0、好ましくは0.5乃至1.0の範囲

で変化させることができる。2 価の金属塩の 3 価の金属塩に対するモル比が金属酸化物のサイズに影響することが観察されている。すなわち、2 価の金属塩の 3 価の金属塩に対するモル比が小さい程、金属酸化物のサイズは小さくなる。2 価の金属塩の 3 価の金属塩に対するモル比はまた得られる磁性粒子の色にも影響する。すなわち、モル比が小さい程得られる磁性粒子の褐色がかかった色は明るくなる。好ましくは、金属酸化物は超常磁性又は常磁性であるが、強磁性金属酸化物もまた使用することができる。ただしこの場合は洗浄の際磁気分離の代わりに遠心が用いられる。

他の 2 価の遷移金属塩、例えばマンガン、マグネシウム、コバルト、ニッケル、亜鉛及び銅の塩で第 1 鉄塩を置き換えてもよい。

金属酸化物が沈殿した後、上澄の pH が中性となるまで、250×g の遠心で数回それを洗浄する。金属酸化物を脱イオン水に再懸濁し、高速で機械的に攪拌して金属酸化物結晶の凝集物を破砕する。更に 250×g で遠沈しても金属酸化物の全部がベレット状になってしまうことはない。小さいサイズの金属酸化物結晶を含有する上澄を集め、ベレットは脱イオン水に再懸濁する。この操作を少なくとも 3 回又は大部分の金属酸化物が 250×g ではもはやベレット状にならなくなる迄繰り返す。この方法で得られる金属酸化物のサイズは通常 2.0 μm 未満である。大きい結晶を除くための 100×g の低速遠心により、サイズが 0.8 μm 未満となる。

平均サイズ 1.0 μm 以下の金属酸化物をモノマーと混合し、開始剤の存在下に 1 乃至 100 μm のサイズの蛍光ポリマーコア粒子、好ましくはポリスチレン粒子上に被覆する。少量の乳化剤の添加は粒子が膠着するのを防止する助けとなろう。次いで蛍光磁性粒子を、金属酸化物の脱落を防止するために、ポリマー、好ましくはポリスチレンの保護層で被覆する。官能基を有する蛍光磁性粒子を望む場合には、生物学的材料を共有結合により結合させるためのカルボキシル基、アミノ基又はヒドロキシル基のような官能基を付与するため、官能基を有するポリマーよりなる別の層で磁性粒子を更に被覆することができる。

本発明に従って調製される蛍光磁性粒子は図 1 に示すことができる。ここにおいて 1 は蛍光コア粒子を表し、2 は金属酸化物/ポリマー被覆を表し、3 は保護ポリマー被覆を表しそして 4 は官能基を有するポリマー被覆を表す。図 2 は、本発明に従って調製される磁性粒子の 0.08 乃至 0.1 μm の切片の透過型電子顕微鏡写真を示す。図 3 は、本発明に従って調製される 6.8 μm の磁性粒子の走査型電子顕微鏡写真を示す。図 3a は、1000 倍、図 3b は 5000 倍の拡大である。

本発明において有用な蛍光ポリマー性コア粒子は、小さい粒子の分散系として得ることのできるものであってモノマーを吸収しそれによって該コア粒子表面上への金

属酸化物とモノマーとの混合物の被覆を生ずることのできるものであれば、いかなるポリマーよりなるものでもよい。コア粒子はいかなるサイズ及び形状でもよいが、好ましくは 1 乃至 100 μm のサイズであり球形の形状になるものである。単分散性コア粒子を使用するときは、得られる磁性粒子もまたサイズにおいて単分散性となろう。コア粒子は、ジビニルベンゼン等の架橋剤を用い又は用いない乳化重合、懸濁重合又は他の重合手段によって得ることができる。コア粒子を調製するのに使用することができるモノマーには例えば、スチレン、メタクリル酸メチル、ビニルトルエン等がある。モノマーの混合物もまた使用することができる。蛍光コア粒子は、当業者に知られている種々の技術を用いて蛍光染料をコア粒子に組み込むことによって得ることができる。磁性金属酸化物による被覆又は保護被覆に使用されるモノマーは、蛍光コア粒子と同じタイプのものであってもなくてもよい。金属酸化物による被覆に使用するモノマーの蛍光コア粒子に対する重量比は、所望の金属酸化物/ポリマー層の厚さに応じて 0.1 乃至 12、好ましくは 0.2 乃至 6 とすることができる。第 1 鉄塩及び第 2 鉄塩の混合物から調製される金属酸化物を被覆に使用する場合には、蛍光コア粒子に対しモノマーを重量比約 0.1 乃至 0.5 にて使用するのが好ましい。しかしながら、マンガン (2 価) 塩及び第 2 鉄塩の混合物から調製される金属酸化物を被覆に使用する場合には、コア粒子に対するモノマー重量比は 0.1 乃至 12 とすることができる。結果として、通常の有機溶媒には不活性な架橋された蛍光磁性粒子を求める場合には、マンガン (2 価) 塩及び第 2 鉄塩の混合物から調製される金属酸化物を、2 % 乃至 10 %、好ましくは 8 % 乃至 10 % の重量比で架橋剤を含有し、コア粒子に対するモノマー重量比が 3 乃至 12、好ましくは 4 乃至 6 であり、蛍光染料に対するモノマー重量比が 0.1 乃至 10 であるモノマーとともに使用するのが好ましい。金属酸化物/ポリマー被覆の際にコア粒子に対し一層低いモノマー重量比 (すなわち 0.1 乃至 0.5) を使用する場合には、蛍光磁性粒子表面上に金属酸化物を一層固く付着させるためにポリマー被覆による保護層で、得られる蛍光磁性粒子を保護被覆するのが好ましい。しかしながら、コア粒子に対し高いモノマー比 (すなわち 3 乃至 12) を使用する場合には、保護ポリマーによる被覆は不要である。重合温度は 55°C 乃至 90°C、好ましくは 55°C 乃至 65°C でもよい。重合開始剤は、過硫酸カリウム等のような水溶性のもので、過酸化ベンゾイル等のような水に不溶性のものでよい。照射、イオン化等の他の重合開始手段もまた使用することができる。意外なことに、被覆にマンガン (2 価) 塩及び第 2 鉄塩の混合物より調製される金属酸化物を使用した場合には、何ら乳化剤を使用することなく蛍光磁性粒子を製造できることが見出された。しかしながら、被覆に第 1 鉄塩と第 2 鉄塩との混合物より調製された金属酸化物を使用した場合には、ドデ

シル硫酸ナトリウム, Aerosol 22, Tween 20又はNonidet P-40 (NP 40) のような乳化剤の少量が金属酸化物/ポリマー被覆の間の粒子の過剰な凝集を防止するのに有用であることが見出された。同じ能力を有する他の乳化剤もまた使用することができる。金属酸化物/ポリマー被覆の間種々の量の金属酸化物を使用することにより、磁性金属酸化物の含量を5%乃至50%、好ましくは10%乃至25%の範囲で変化させることができる。金属酸化物の含量を高めるために、金属酸化物/ポリマー多重被覆を行うこともできる。所望の特性を有する磁性粒子が得られる限り、重合に通常使用される他の成分を加えてもよい。金属酸化物/ポリマー被覆のための成分は、金属酸化物/ポリマー被覆工程の最初に全部一度加えてもよく、又は段階的に加えてもよい。第1鉄塩と第2鉄塩との混合物より製した金属酸化物を使用する場合には、成分を段階的に加えるのが好ましい。成分は真空中又はアルゴン等の不活性ガス下において、機械的攪拌、ゆすることその他の攪拌手段により混合することができる。官能基は、金属酸化物/ポリマー被覆の間モノマーと官能基を有するモノマーとの混合物を用いることによって又は官能基を有するモノマーの薄層で磁性粒子を最後に再被覆することによって蛍光磁性粒子の表面上に組み込むことができる。使用する官能基を有するモノマーは、次のものの一又は混合物から選ぶことができる：メタクリル酸2-ヒドロキシエチル、メタクリル酸2-アミノエチル、メタクリル酸トリメチルアンモニウムメチルメトサルフェート、メタクリル酸ジメチルアミノエチル、メタクリル酸、ウンデシレン酸、メチルプロペンシルホン酸、ウンデシレンアルコール、オレイルアミン、メタクリル酸グリシジル、アクロレイン、グルタルアルデヒド等。磁性蛍光粒子はまた、金属酸化物/ポリマー被覆又は保護被覆に使用したのとは異なるポリマーの層で再被覆してそのポリマーの表面特性を帯びさせることもできる。

蛍光磁性粒子の利用

蛍光イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、細胞分離、酵素固定化及びアフィニティー精製等の種々の用途のための固相としての種々の蛍光磁性粒子の使用は、次の論文に例示するように、文献にて検討されている：Hirschbein et al, Chemical Technology, March 1982, 172-179 (1982) ; Pourfarzaneh, The Ligand Quarterly, 5 (1) : 41-47 (1982) ; Hallin and Dunnill, Enzyme Microbe Technology, 2: 2-10 (1980) ; Mosbach and Anderson, Nature, 270: 259-261 (1977) ; Guesdon et al, J. Allergy Clinical Immunology, 61 (1) , 23-27 (1978) . いくつかの利用についてはまた、酵素固定化について米国特許第4152210号及び第4343901号に、細胞分離について米国特許第3970518号、第4230685号及び第42672343号に、イムノアッセイについて米国特許第4554088号、第4628037号及び第3933

997号に夫々開示されている。

ある用途には有用であるが他の用途には有用でない磁性粒子もある。例えば、米国特許第4554088号及び第4638037号に開示されている磁性粒子は、通常ポリマー性シランの被覆に囲まれた超常磁性金属酸化物コアよりなるが、その大きな表面積と緩慢な沈澱速度のためイムノアッセイとアフィニティー精製には有用であるが、骨髓洗浄のような細胞分離への利用には適さない。これら2つの特許に開示された磁性粒子はサイズが小さいため、細胞懸濁液から全ての磁性粒子を効果的に除去することは非常に困難である。更に、小さい磁性粒子ほど正常な細胞への非特異的結合がずっと高くなる。骨髓細胞の精製のための磁性粒子の使用においては、磁性粒子はヒツジ抗マウス IgG のような抗体で被覆され、骨髓は癌細胞の表面抗原に対する数種のモノクローナル抗体の混合物で処理される。磁性粒子は癌細胞にのみ結合し、強力な磁場を通過させることにより癌細胞を正常細胞から分離することができる。洗浄された細胞は次いで患者に戻される。

本発明の方法を用いることにより、広範な種類の生物医学的な利用のために、磁性粒子のサイズ、表面積、金属酸化物含量及び表面特性を最適にすることができる。本発明により製造される磁性粒子は、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、DNA/RNAハイブリダイゼーションアッセイその他の診断用途のための固相として使用することができる。イムノアッセイは、サンドイッチアッセイや競合的結合アッセイ等の当業者に明らかな種々の形態で行うことができる。DNA/RNAハイブリダイゼーションもまた、固相ハイブリダイゼーション又は液相ハイブリダイゼーション等の種々の形態で行うことができる。固相ハイブリダイゼーションの形態では、DNA又はRNAプローブ（キャッチャープローブ）は磁性粒子に最初に固定化される。固定化されたキャッチャープローブは、サンプル（サンプルDNA）からの相補的DNA鎖とハイブリッド化するのに使用される。最後に、蛍光性、放射性又は酵素トレーサーで標識されたDNAサンプルの別の部分とハイブリッド化することのできる別のプローブ（シグナルプローブ）がシグナル発生に使用される。液相ハイブリダイゼーション形態においては、キャッチャープローブとシグナルプローブは最初に液相でサンプルDNAとハイブリッド化され、次いで磁性粒子に固定化される。

代わりに、アッセイの感度を高めるために、シグナルプローブを1個又は数個のビオチン基で標識することもでき、その場合ビオチン基を蛍光性、放射性又は酵素トレーサーで標識したアビジンと結合させることにより、シグナルが検出される。

イムノアッセイ及びDNA/RNAハイブリダイゼーションアッセイは、生物学的サンプル中の薬物、ホルモン、抗体、ペプチド、DNA、RNA、核酸、ウイルス抗原及び炭水化

物等の広範な種類の物質を測定するのに使用することができる。

本発明によって製造される磁性粒子もまた、アフィニティー精製、細胞分離、酵素固定その他の生物医学的用途に使用することができる。細胞分離においては、磁性粒子は、免疫反応又は非免疫反応による望まない細胞の除去（ネガティブ選別）のため又は望む細胞の濃縮（ポジティブ選別）のために使用される。この原理は、骨髄から癌細胞を除去（骨髄洗浄）し、組織培養のためにポジティブ又はネガティブ選別によって細胞集団を精製し及び種々の細胞イムノアッセイを行うのに使用することができる。アフィニティー精製においては、磁性粒子は、抗体、抗原、酵素、阻害剤、コファクター、1本鎖DNA、結合タンパク、ハプテン及び炭水化物等の広範な種類の生物学的材料の精製に、ポリアクリルアミドゲル、セファロースゲル又は他のセルロースビーズのような慣用の固相に代えて使用される。アフィニティー精製に類似の他の用途においては、磁性粒子は、抗血清又は臨床サンプルから望ましくないタンパク質成分を交差吸着して除去するのに使用することができる。酵素固定化においては、酵素活性を保持し固定化酵素の再使用を可能にするよう、種々の結合手段によって磁性粒子上に酵素が固定化される。固定化酵素を担持した磁性粒子は、炭水化物、アミノ酸及びタンパク質等の広範な種類の材料を製造するための固定化酵素システムに通常使用されるガラスビーズ、制御された多孔性ガラス、シリカゲル及びセルロースビーズ等の他の固相に代えて使用することができる。

生物学的材料を担持した又は担持しないこれらの蛍光磁性粒子は、正しい数の粒子がウエル中に放出されていることを確認するため及びアッセイ中の粒子の損失をチェックするためのマーカーとして役立てるために、実施例42及び43に述べた種々のアッセイのための非磁性粒子に対し種々の比率で組み込むことができる。

これらの利用はいずれも、磁性粒子の大部分に共通な分離容易性、速い反応速度及び大きな表面積によって効率化される。以下の実施例は本発明の多能性と利点を更に説明するために提供するものであり、その詳細を制限的に解釈してはならない。本発明の精神と範囲から逸脱することなく種々の均等物、変更物及び修飾物の実施をなし得ることは明らかであり、そのような均等の具体例は本発明に含まれることが意図されているからである。

金属酸化物の調製の一般的方法

実施例1

機械的攪拌機、冷却器、温度計、滴下ロート及び加熱マントルを備えた三つ口丸底フラスコに、400mlの脱イオン水中に0.361molの硫酸第1鉄及び0.369molの硫酸第2鉄（ $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 比=1）の混合物を加えた。混合物を攪拌しつつ85乃至90℃に加熱し、850mlの6N水酸化ナ

トリウムを90分かけて滴下して加えた。混合物を85乃至90℃にて更に1時間攪拌し、室温まで冷却した。金属酸化物の沈殿を250×gにて10分間遠心した。透明な上澄を傾斜して捨てベレットを90mlの脱イオン水中に機械的攪拌機を用いて再懸濁させた。この洗浄工程を6回又は上澄のpHが殆ど中性となるまで繰り返した。上澄を傾斜して捨て、200mlの脱イオン水に再懸濁させた。250×gで更に遠心しても金属酸化物の沈殿の全てがベレットになることはない。小さいサイズの金属酸化物結晶を含む上澄を集め、ベレットは200mlの脱イオン水に再懸濁させた。この工程は少なくとも3回又は金属酸化物の殆どが250×gではもはやベレットを生じなくなるまで繰り返した。この方法で得られる金属酸化物は通常2.0μm未満のサイズを有する。金属酸化物の懸濁液を合わせ100×gで10分間遠心した。上澄を回収し、0.8μm未満のサイズの磁性金属酸化物の8.6%w/v懸濁液800mlを得た。

実施例2

400mlの脱イオン水中0.235molの硫酸第1鉄、0.297molの硫酸第2鉄（ $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 比=0.79）及び480mlの6N水酸化ナトリウムを使用して磁性金属酸化物の2.8%w/v懸濁液2000mlを得た以外は、実施例1の記載と同一の手順に従った。

実施例3

400mlの脱イオン水中0.178molの硫酸第1鉄、0.298molの硫酸第2鉄（ $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 比=0.59）及び520mlの6N水酸化ナトリウムを使用して磁性金属酸化物の2.98%w/v懸濁液1500mlを得た以外は、実施例1の記載と同一の手順に従った。

実施例4

400mlの脱イオン水中0.15molの硫酸第1鉄、0.276molの硫酸第2鉄（ $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 比=0.54）及び520mlの6N水酸化ナトリウムを使用して磁性金属酸化物の6.88%w/v懸濁液700mlを得た以外は、実施例1の記載と同一手順に従った。

実施例5

255mlの脱イオン水中0.116molの硫酸マンガン、0.146molの硫酸第2鉄（ $\text{Mn}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 比=0.79）及び240mlの6N水酸化ナトリウムを使用して磁性金属酸化物の1.8%w/v懸濁液1700mlを得た以外は、実施例1の記載と同一の手順に従った。

磁性粒子の調製

実施例6

600mlの脱イオン水、6mlのステレン及び、実施例1の記載に従って調製した8.6%w/vの磁性金属酸化物80mlの混合物を密封された瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55℃のオープン中1時間回転した。混合物に12gの過硫酸カリウム及び5%w/vの4.0μmポリスチレン粒子850mlを加えた。瓶を再び密封し、吸引して1時間回転し、そして2%のドデシル硫酸ナトリウム50mlを加え

13

た。更に5時間経過後、混合物に6mlのステレン及び10gの過硫酸カリウムを加えた。混合物を更に15時間回転し、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離して上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を脱イオン水に再懸濁させて1.6lとし、約11%の磁性金属酸化物含量を有し4.3μmの平均サイズを有する2.5%w/v懸濁液を得た。

実施例7

実施例6の記載に従って調製した2.5%w/vの磁性粒子1.6lを、1gのドデシル硫酸ナトリウム、10gの過硫酸カリウム及び、4mlのメタノール中に0.98mlのウンデシレン酸と0.02mlのジビニルベンゼンを含有する溶液を加えることによりカルボキシル化した。混合物を密封した瓶に加え、吸引して約60rpmで55°Cのオープン中5時間回転した。得られたカルボキシル磁性粒子を磁氣的に分離し、上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。カルボキシル磁性粒子を脱イオン水に再懸濁させて680mlとし、約11%の磁性金属酸化物含量を有し4.3μmの平均サイズを有する5.8%w/v懸濁液を得た。

実施例8

600mlの脱イオン水、6mlのステレン及び、実施例1の記載に従って調製した8.6%w/vの磁性金属酸化物80mlを密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55°Cのオープン中1時間回転した。混合物に12gの過硫酸カリウム及び4.78%w/vの6.1μmポリスチレン粒子850mlを加えた。瓶を再び密封し、吸引して5時間回転し、そして6mlのステレン及び10gの過硫酸カリウムを加えた。混合物を更に15時間回転し、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離しそして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を1.5lの脱イオン水に再懸濁させ、1gのドデシル硫酸ナトリウム、10gの過硫酸カリウム及び、4mlのメタノール中に0.98mlのウンデシレン酸と0.02mlのジビニルベンゼンを含有する溶液を加えることによりカルボキシル化した。混合物を密封した瓶に加え、吸引して約60rpmで55°Cのオープン中5時間回転した。得られたカルボキシル磁性粒子を磁氣的に分離して上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。カルボキシル磁性粒子を脱イオン水に再懸濁させて800mlとし、約11.6%の磁性金属酸化物含量を有し6.8μmの平均サイズを有する4.3%懸濁液を得た。

実施例9

600mlの脱イオン水、6mlのステレン及び、実施例1の記載に従って調製した8.6%w/vの磁性金属酸化物60mlを含む混合物を三つ口丸底フラスコに加え、アルゴン雰囲気下67°Cにて1時間攪拌した。混合物に12gの過硫酸カリウム及び5%w/vの2.7μmポリスチレン粒子470mlを加えた。混合物を67°Cにて1時間攪拌し、2%のドデシル硫酸ナトリウム30mlを加えた。アルゴン雰囲気下67°Cにて更に5時間攪拌した後、混合物に6mlのステレン及び6gの過硫酸カリウムを加えた。混合物をアルゴン雰囲気

14

気下67°Cにて更に15時間攪拌し、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離しそして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を脱イオン水に再懸濁させて90mlとし、0.6gのドデシル硫酸ナトリウム、10gの過硫酸カリウム及び、2.4mlのメタノール中に0.598mlのウンデシレン酸と0.012mlのジビニルベンゼンを含有する溶液を加えることによりカルボキシル化した。混合物を密封した瓶に加え、吸引して約60rpmで55°Cのオープン中5時間回転した。得られたカルボキシル磁性粒子を磁氣的に分離しそして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。カルボキシル磁性粒子を再懸濁させて500mlとし、約14%の磁性金属酸化物含量を有し4.0μmの平均サイズを有する6.5%w/vの懸濁液を得た。

実施例10

600mlの脱イオン水、6mlのステレン及び、実施例1の記載に従って調製した8.6%w/vの磁性金属酸化物60mlを含む混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55°Cのオープン中1時間回転した。混合物に12gの過硫酸カリウム及び5%w/vの2.7μmポリスチレン粒子470mlを加えた。瓶を再び密封し、吸引して1時間回転しそして2%のドデシル硫酸ナトリウム30mlを加えた。更に5時間経過後、6mlのステレン及び10gの過硫酸カリウムを混合物に加えた。混合物を更に15時間回転し、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離し、上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を脱イオン水に懸濁させて500mlとし、約14%の磁性金属酸化物含量を有し4.0μmの平均サイズを有する6.8%w/vの懸濁液を得た。

実施例11

180mlの脱イオン水、2mlのステレン及び、実施例1の記載に従って調製した8.6%w/vの磁性金属酸化物20mlを含む混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55°Cのオープン中1時間回転した。混合物に4gの過硫酸カリウム及び、実施例10の記載に従って調製した6.8%w/vの磁性粒子(3.0μm、金属酸化物含量14%)160mlを加えた。瓶を再び密封し、吸引して1時間回転しそして2%のドデシル硫酸ナトリウム10mlを加えた。更に5時間の後、2mlのステレン及び2gの過硫酸カリウムを混合物に加えた。混合物を更に15時間回転し、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁氣的に分離しそして上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を脱イオン水に懸濁して160mlとし、約19%の金属酸化物含量を有し4.2μmの平均サイズを有する7.78%w/vの懸濁液を得た。

実施例12

90mlの脱イオン水、1mlのステレン及び、実施例1の記載に従って調製した8.6%w/vの磁性金属酸化物10mlを含む混合物を、密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55°Cのオープン中1時間回転した。混合物に1

15

9gの過硫酸カリウム及び、実施例11の記載に従って調製した7.78%w/vの磁性粒子(3.2 μ m,金属酸化物含量19%)80mlを加えた。瓶を再び密封し、吸引して4時間回転し、2%のドデシル硫酸ナトリウム5mlを加えた。更に5時間経過の後、1mlのステレン及び1gの過硫酸カリウムを混合物に加えた。混合物を更に15時間回転し、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁気的に分離しそして上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を脱イオン水に再懸濁させて160mlとし、約2.3%の金属酸化物含量を有し4.5 μ mの平均サイズを有する4.5%の懸濁液を得た。

実施例13

400mlの脱イオン水、1.92mlのステレン、0.08mlのジビニルベンゼン、4gの過硫酸カリウム、20gの200~400メッシュの4%ジビニルベンゼン架橋ポリスチレンビーズ及び、実施例1に従って調製した8.6%w/vの磁性金属酸化物10mlを含有する混合物を密封された瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55°Cのオープン中15時間回転した。混合物を沈澱させ上澄を傾斜して捨てた。得られた磁性ビーズを200mlの脱イオン水に再懸濁させ再度沈澱させた。上澄が透明になる迄数回この工程を繰り返した。得られた磁性ビーズを200mlの脱イオン水に再懸濁させ、0.1gのドデシル硫酸ナトリウム、2.0gの過硫酸カリウム、0.48mlのステレン及び0.02mlのジビニルベンゼンを加えた。瓶を再び密封し、吸引して約60rpmで55°Cのオープン中1時間回転しそして、0.4mlのメタノール中に0.098mlのウンデシレン酸と0.002mlのジビニルベンゼンを含有する溶液を加えた。混合物を更に4時間回転し、前述のように重量により沈降させることによって洗浄した。水を濾過により除去しカルボキシル磁性ビーズを乾燥して200~400メッシュのカルボキシル磁性ビーズ20gを得た。

実施例14

100mlの脱イオン水、0.5mlのステレン、2gの過硫酸カリウム、5%w/vの4.0 μ mポリスチレン粒子75ml及び、実施例4の記載に従って調製した6.88%w/vの磁性金属酸化物10mlを含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55°Cのオープン中15時間回転した。混合物を、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁気的に分離しそして上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を脱イオン水に再懸濁させて150mlとし、約14%の金属酸化物含量を有し4.3 μ mの平均サイズを有する2.5%w/v懸濁液を得た。

実施例15

実施例4の記載に従って調製した6.88%w/vの磁性金属酸化物20mlを使用して約18%の金属酸化物含量を有し4.3 μ mの平均サイズを有する2.5%w/vの懸濁液160mlを得た以外は、実施例14の記載と同じ手順に従った。

実施例16

2000mlの脱イオン水、13mlのステレン及び、実施例3

16

の記載に従って調製した2.98%w/vの磁性金属酸化物550mlを含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55°Cのオープン中1時間回転した。混合物に20gの過硫酸カリウム及び10%w/vの3.0 μ mポリスチレン粒子950mlを加えた。瓶を再び密封し、吸引して60rpmで1時間回転しそして2%のドデシル硫酸ナトリウム60mlを加えた。更に5時間経過の後、8mlのステレン及び10gの過硫酸カリウムを混合物に加えた。混合物を更に15時間回転し、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁気的に分離しそして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を脱イオン水に再懸濁して3000mlとし、約12%の磁性金属酸化物含量を有し3.2 μ mの平均サイズを有する3.38%w/vの懸濁液を得た。

実施例17

実施例16の記載に従って調製した磁性粒子(3.2 μ m, 3.38%w/v,金属酸化物含量12%)150ml,2mlの1%NP40,0.5mlのメタクリル酸メチル又はステレン、1gの過硫酸カリウム及び、官能基を有するモノマーであるメチル硫酸メタクリル酸トリメチルアンモニウムエチル(40%水溶液)を含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を約60rpmで55°Cのオープン中4時間回転した。混合物を、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁気的に分離しそして上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を脱イオン水中に再懸濁させて200mlとし、表面上にトリメチルアンモニウム官能基を有する磁性粒子の2.5%w/vの懸濁液を得た。

実施例18

官能基を有するモノマーであるメタクリル酸2-アミノエチル1mlを使用して表面上にアミノ基を有する磁性粒子の2.5%w/vの懸濁液200mlを得た以外は、実施例17に記載されたと同じ手順に従った。

実施例19

官能基を有するモノマーであるメタクリル酸2-ヒドロキシエチル1mlを使用して表面上にヒドロキシル基を有する磁性粒子の2.5%w/v懸濁液200mlを得た以外は、実施例17に記載されたと同じ手順に従った。

実施例20

モノマーとして1-ビニル-2-ピロリジノン1mlを使用して表面上にポリビニルピロリジンを有する磁性粒子の2.5%w/v懸濁液200mlを得た以外は、実施例17の記載と同じ手順に従った。

実施例21

官能基を有するモノマーであるメチルプロペンスルホン酸1gを使用して表面上にスルホン酸基を有する磁性粒子の2.5%w/v懸濁液200mlを得た以外は、実施例17に記載と同じ手順に従った。

実施例22

官能基を有するモノマーであるメタクリル酸ジメチルアミノエチル1mlを使用して表面上にジメチルアミノ基

を有する磁性粒子の2.5%w/v懸濁液200mlを得た以外は、実施例17の記載と同じ手順に従った。

実施例23

7.0%w/vの2.11 μ mポリスチレン粒子20ml,実施例5の記載に従って調製した1.8%w/vの金属酸化物100ml,50mlの脱イオン水及び、7.5mlのステレン中に0.15gの過酸化ベンゾイルを含む溶液を含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して60rpmで55°Cのオープン中15時間回転した。混合物を、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁気的に分離しそして上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。得られた磁性粒子を脱イオン水に再懸濁させて200mlとし、約16.8%の金属酸化物含量を有し3.6 μ mの平均サイズを有する5.0%w/vの懸濁液を得た。

実施例24

7.0%w/vの2.11 μ mポリスチレン粒子20ml,実施例5の記載に従って調製した1.8%w/vの金属酸化物100ml,50mlの脱イオン水及び、6.75mlのステレン中に0.15gの過酸化ベンゾイルと0.75mlのジビニルベンゼンとを含む溶液を含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55°Cのオープン中15時間回転した。混合物を、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁気的に分離しそして上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。得られた架橋磁性粒子を脱イオン水に再懸濁させて200mlとし、約16.8%の金属酸化物含量を有し3.6 μ mの平均サイズを有する5.0%w/vの懸濁液を得た。こうして調製した架橋磁性粒子はサイズが均一であり通常の有機溶媒例えば、アセトン、アセトニトリル及びジメチルホルムアミド等に対して不活性であることが判明した。

実施例25

7.0%w/vの2.11 μ mポリスチレン粒子20ml,実施例5の記載に従って調製した1.8%w/vの金属酸化物150ml及び、6.75mlのステレン中に0.15gの過酸化ベンゾイルと0.75mlのジビニルベンゼンとを含む溶液を含有する混合物を密封された瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55°Cのオープン中15時間回転した。混合物を、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁気的に分離しそして上澄が透明になる迄脱イオン水で数回洗浄した。得られた架橋磁性粒子を脱イオン水に再懸濁させて200mlとし、約23%の金属酸化物含量を有し4.0 μ mの平均サイズを有する5.4%w/vの懸濁液を得た。こうして調製した架橋磁性粒子はサイズが均一であり通常の有機溶媒例えば、アセトン、アセトニトリル及びジメチルホルムアミド等に対して不活性であることが判明した。

実施例26

9.16%w/vの3.2 μ mポリスチレン粒子15ml,実施例5の記載に従って調製した1.8%w/vの金属酸化物100ml,55mlの脱イオン水及び、6.75mlのステレン中に0.15gの過酸化ベンゾイルと0.75mlのジビニルベンゼンとを含む溶液を含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引し

て約60rpmで55°Cのオープン中15時間回転した。混合物を、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁気的に分離しそして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。得られた架橋磁性粒子を脱イオン水に再懸濁して200mlとし、約16.8%の金属酸化物含量を有し5.5 μ mの平均サイズを有する4.7%w/vの懸濁液を得た。こうして調製した架橋磁性粒子はサイズが均一であり通常の有機溶媒例えば、アセトン、アセトニトリル及びジメチルホルムアミド等に対して不活性であることが判明した。

実施例27

4.5%w/vの4.1 μ mポリスチレン粒子30ml,実施例5の記載に従って調製した1.8%w/vの金属酸化物100ml,40mlの脱イオン水及び、6.75mlのステレン中に0.15gの過酸化ベンゾイルと0.75mlのジビニルベンゼンとを含む溶液を含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55°Cのオープン中15時間回転した。混合物を、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁気的に分離しそして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。得られた架橋磁性粒子を脱イオン水に再懸濁して200mlとし、約16.9%の金属酸化物含量を有し6.7 μ mの平均サイズを有する4.5%w/vの懸濁液を得た。こうして調製された架橋磁性粒子はサイズが均一であり通常の溶媒例えば、アセトン、アセトニトリル及びジメチルホルムアミド等に対して不活性であることが判明した。

実施例28

7.0%w/vの2.11 μ mポリスチレン粒子20ml,実施例5の記載に従って調製した1.8%w/vの金属酸化物100ml,50mlの脱イオン水及び、6mlのステレン中に0.15gの過酸化ベンゾイルと0.75mlのウンデシレニルアルコールと0.75mlのジビニルベンゼンとを含む溶液を含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで55°Cのオープン中15時間回転した。混合物を、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁気的に分離しそして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。得られた架橋ヒドロキシル磁性粒子を濾過し乾燥して約16.8%の金属酸化物含量を有し3.9 μ mの平均サイズを有する9gの粉末を得た。こうして調製された架橋ヒドロキシル磁性粒子はサイズが均一であり通常の溶媒例えば、アセトン、アセトニトリル及びジメチルホルムアミド等に対して不活性であることが判明した。

磁性粒子への生物学的材料の結合

実施例29

80mlの瓶中に、実施例17の記載に従って調製した4.3 μ mの5.0%w/vカルボキシル磁性粒子30mlを加えた。粒子を磁気的に分離し50mlのリン酸緩衝液(0.1M,pH5.5)に再懸濁させた。粒子懸濁液に20mgのウシ血清アルブミン及び100mgの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)を加えた。混合物を室温にて2時間回転しそして磁気的に分離した。粒子を80mlのリン酸緩衝液で1回洗い、そしてリン酸緩衝食塩

19

水 (0.1M, pH7.0) に再懸濁させて75mlとし、2.0%w/vの懸濁液を得た。

ウシ血清アルブミンを受動的吸着により磁性粒子に結合させるためにはEDCを使用しないこと以外は同じ手順に従った。

実施例30

4mlのバイアル中に、実施例7の記載に従って調製した4.3μmの5.0%w/vカルボキシル磁性粒子1mlを加えた。粒子を磁気的に分離し2mlのリン酸緩衝液 (0.1M, pH5.5) で1回洗いそして2mlの同緩衝液で再懸濁させた。粒子懸濁液に、1.4mq/mlのヤギ (Gt) 抗マウス (Ms) IgG 140ml及び10mqの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドを加えた。バイアルを室温にて2時間回転した。粒子を磁気的に分離し、2mlのリン酸緩衝液で1回洗いそして2mlのリン酸緩衝食塩水 (0.1M, pH7.0) で再懸濁させて2mlとし2.5%w/vのヤギ抗マウスIgG被覆磁性粒子を得た。モノクローナルな又はポリクローナルな他の種類の抗体もまた同じ手順によってカルボキシル磁性粒子に結合させることができる。

ヤギ抗マウスIgGその他の種類の抗体を受動的吸着によって磁性粒子に結合させるためには、EDCを使用しないこと以外は同じ手順に従った。

実施例31

4mlのバイアル中に、実施例29の記載に従って調製したウシ血清アルブミン被覆磁性粒子 (4.3μm, 2%w/v) 2.5mlを加えた。粒子を磁気的に分離し、2mlのリン酸緩衝液 (0.1M, pH5.5) に再懸濁させて2mlとした。混合物に10μlのマウス抗B赤血球表面抗原 (20mq/ml) 及び1mqの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドを加えた。混合物を室温にて2時間回転した。粒子を磁気的に分離し、リン酸緩衝液で1回洗いそして2mlのリン酸緩衝食塩水 (0.1M, pH7.0) に再懸濁させ、2.5%w/vの懸濁液を得た。

実施例32

40μlのマウス抗A赤血球表面抗原 (5mq/ml) を使用して2.5%w/vの懸濁液2mlを得た以外は、実施例31の記載と同じ手順に従った。

磁性粒子を用いた血液型判定

実施例33

Aとラベルした5mm×65mmの試験管中に、実施例32の記載に従って調製した2.5%w/vのマウス抗A被覆磁性粒子25μlを加えた。Bとラベルした別の試験管中には、実施例31の記載に従って調製した2.5%w/vのマウス抗B被覆磁性粒子25μlを加えた。双方の試験管に、バック赤血球を等張緩衝食塩水で1対100に希釈して調製した1%バック赤血球50μlを加えた。指で数回軽くたたいて試験管を振り磁石の上に置いた。結果は以下に要約した通りであった。

血液型

A B O AB

20

試験管 A	+	-	-	+
試験管 B	-	+	-	+

ここに+は陽性反応を示す。すなわち、赤血球は対応する抗体を被覆した磁性粒子によって凝集し、その結果磁気分離後は試験管の上澄は透明であった。他方、陰性反応の上澄は、赤血球と抗体被覆磁性粒子との間での凝集がないため、磁気分離後も濁ったままである。

磁性粒子を用いたイムノアッセイ

実施例34

2mlの微量遠心管中に、6%w/vの3μmカルボキシル磁性粒子1mlを加えた。粒子を1000rpmで3分間遠心した。上澄を吸引し、粒子を酢酸緩衝液中で5乃至100μg/mlの組み換えHBcAg 1mlとともに振り混ぜることによって再懸濁させた。管を室温にて2時間回転させそして前記のように遠心した。上澄を吸引し、粒子を、酢酸緩衝液と2乃至10%の正常動物血清を含む再被覆溶液1mlに再懸濁させた。管を室温にて2乃至16時間回転させそして前記のように遠心した。上澄を吸引し、遠心と再懸濁とにより1mlの等張緩衝食塩水 (IBS) で3回洗浄した。最後に、粒子を1mlのIBSで再懸濁させ2乃至8℃にて貯蔵した。

実施例35

96ウェルのマイクロ滴定板の最初の2列に、実施例34の記載に従って調製した0.25%w/vのB型肝炎コア抗原 (HBcAg) 被覆磁性粒子20μlを加えた。サンプルの調製は、HBcAg陽性血清を陰性血漿で種々に希釈し、更に各サンプルを標本希釈緩衝液 (SDB) で1:100に希釈することにより行った。SDBは、リン酸緩衝液、タンパク質安定化剤、界面活性剤、及び抗菌剤を含有するものであった。粒子を含有するウェルに、各最終のサンプル希釈液50μlを加えた。37℃で30分間インキュベーションの後、粒子を磁気分離機で2分間分離し、塩類と界面活性剤とを含有する洗浄用緩衝液200μlで3回洗浄した。粒子を含む各ウェルに、塩類、タンパク質安定化剤、グリセロール、界面活性剤及び抗菌剤を含有する希釈液中のヤギ抗ヒトIgG-B-Dガラクトシダーゼ結合体 (0.5μg/ml) 50μlを加えた。37℃で15分間のインキュベーションの後、粒子を分離し上記のようにして3回洗浄し、30μlのIBSに再懸濁させた。粒子を黒いマイクロ滴定板 (Dynatech) の最初の2列に移した。粒子を含む各ウェルに、4-メチルウンベリフェリル-B-ガラクトピラノシド (MUG, Sigma) を含有する溶液100μlを加えた。板を37℃にてインキュベートし、蛍光強度を、励起側365nm及び蛍光側450nmのフィルターを備えた蛍光強度分析機 (FCA, Pandex) を用い5分間隔で10倍利得にセットして測定した。5分間隔での蛍光強度の増大を任意に定めた蛍光単位 (AFU) にて記録して表1に示した。

21

表 I

陽性標本の希釈率 AFU(5分)2個のウエルの平均値

1:100	22687
1:1000	5933
1:5000	1516
1:8000	835
1:10000	639
1:15000	495
1:20000	427
1:25000	307

実施例36

マウス抗HBsAgのカルボキシル磁性粒子への結合は実施例30と同様であった。

黒の96ウエルのマイクロ滴定板 (Dynatech) のウエルに、0.25%w/vの3.2μmマウス抗HBsAg被覆カルボキシル磁性粒子20μlを2列に加えた。磁性粒子を含むウエルに、種々の量のHBsAgを含有する無処理血漿又はHBsAg陰性血漿100μlを加えた。37℃にて30分間インキュベーションした後、磁気分離機により粒子を2分間分離し、塩類と界面活性剤とを含有する洗浄用緩衝液100μlで1回洗った。粒子を含む各ウエルに、塩類、タンパク質安定化剤、グリセロール、界面活性剤及び抗菌剤を含有する希釈液中のマウス抗HBsAg-B-ガラクトシダーゼ結合体20μlを加えた。37℃にて15分間インキュベーションの後、粒子を分離し上記のようにして5回洗浄した。粒子を含む各ウエルに、4-メチルウンベリフェリル-B-D-ガラクトピラノシド (MUG, Sigma) を含有する溶液50μlを加えた。板を37℃でインキュベートし、蛍光強度を、励起側365nm及び蛍光側450nmのフィルターを備えた蛍光濃度分析機 (FCA, Pandex) により5分間隔で10倍利得に設定して測定した。5分間隔での蛍光強度の増大を任意に定めた蛍光単位 (AFU) にて記録し、表IIに示した。

表 II

HBsAg濃度 (ng) AFU(5分)2個のウエルの平均値

1.0	1149
0.5	455
0.25	218
0.125	118
陰性	14

実施例37

HTLV-III B/H-9細胞 (Gallo株) からのHTV-1抗原を、実施例34の記載と同様の手順により3.6μmのカルボキシル磁性粒子に結合させた。

96ウエルのマイクロ滴定板のウエルに、0.25%w/vのHIV被覆磁性粒子20μlを2列に加えた。粒子を含むウエルに、リン酸緩衝液、タンパク質安定化剤、界面活性剤及び抗菌剤を含有する標本希釈緩衝液 (SDB) に1:100に希釈した陽性、境界及び陰性の各標本50μlを加えた。37

22

℃にて30分間のインキュベーションの後、磁気分離機により2分間粒子を分離しそして塩類と界面活性剤とを含有する洗浄用緩衝液100μlで3回洗浄した。粒子を含む各ウエルに、塩類、タンパク質安定化剤、グリセロール、界面活性剤および抗菌剤を含有する希釈液中のヤギ抗ヒト-B-ガラクトシダーゼ (約0.5μg/ml) 結合体50μlを加えた。37℃にて15分間インキュベーションした後、上記のようにして粒子を4回洗浄した。粒子を黒のマイクロ適当板 (Dynatech) に移した。粒子を含む各ウエルに、4-メチルウンベリフェリル-B-D-ガラクトピラノシド (MUG, Sigma) を含有する溶液100μlを加えた。板を37℃にてインキュベートし、蛍光強度を、励起側365nm及び蛍光側450nmのフィルターを備えた蛍光濃度分析機 (FCA, Pandex) を用いて5分間隔で25倍利得に設定して測定した。5分間隔での蛍光強度の増大を任意に定めた蛍光単位 (AFU) にて記録し表IIIに示した。

表 III

抗HIV標本 AFU(5分)2個のウエルの平均値

陽性対照	9462
境界標本	527
陰性対照	86

磁性粒子を用いた細胞分離

実施例38

実施例7の記載に従って調製した4.3μmのカルボキシル磁性粒子を、リン酸緩衝食塩水 (PBS, pH7.7) で洗浄し超音波処理し、70%エタノールで10分間滅菌し、PBSで3回洗浄し、0.5mg/mlのアフィニティ精製ヒツジ抗マウスイムノグロブリン抗体 (SAM) とともに3.3mg抗体/100mg粒子の比率で4℃にて48時間インキュベートした。使用前に、抗体被覆磁性粒子をPBSで洗浄し、PBS中に所望の濃度に再懸濁させた。

ヒト組織培養CALLA陽性NALM-16白血病細胞をPBSで洗い懸濁させた。一部は抗体による処理をしなかった (-MoAb)。他の部分を2つの抗CD10モノクローナル抗体及び1つの抗CD9モノクローナル抗体で4℃にて30分間処理し (+MoAb) , PBSで洗い、PBSにて 3.5×10^6 個/mlに調整した。一方には抗体処理細胞 (+MoAb) を含む他方には無処理細胞 (-MoAb) を含む2本の試験管に、SAM被覆磁性粒子を開始時の細胞に対する粒子の比率が45となるように加えた。管を4℃にて30分間回転した。粒子を磁気分離機で分離した。上澄を回収し遠心して残存細胞を回収した。ペレットを100μlのトリパンブルーに再懸濁させて全細胞数を数えた。結果を表IVに示した。

表 IV

粒子/細胞比	+/-MoAb細胞	回収細胞	消耗%
0	+	7.62×10^5	0(対照)
45	+	2.89×10^4	96.2
45	-	7.33×10^5	4.6

実施例39

576mlの脱イオン水、9mlのステレン及び、実施例1の

23

記載に従って調製した3.0%w/vの磁性金属酸化物288mlを含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで65±4℃のオープン中1時間回転した。混合物に、18gの過硫酸カリウム及び5%w/vの4.0μm蛍光ナイル赤ポリスチレン粒子712mlを加えた。瓶を再び密封し、吸引して1時間回転し、そして2.0%のドデシル硫酸ナトリウム45mlを加えた。更に5時間経過の後、9mlのステレン及び9gの過硫酸カリウムを混合物に加えた。混合物を更に15時間回転し、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁気的に分離し、そして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。得られた蛍光磁性粒子を脱イオン水に懸濁して1580mlとし、約11.0%の磁性金属酸化物含量を有し4.4μmの平均サイズを有する3.0%w/v懸濁液を得た。

実施例40

実施例39の記載に従って調製した3.0%w/vの蛍光ナイル赤磁性粒子1.580lを、1.23gのドデシル硫酸ナトリウム、17.50gの過硫酸カリウム及び、4.8mlのメタノール中に1.2mlのウンデシレン酸と0.024mlのジビニルベンゼンとを含有する溶液の添加によりカルボキシル化した。混合物を密封した瓶に加え、吸引して約60rpmで55~65℃のオープン中5時間回転した。得られた蛍光ナイル赤カルボキシル磁性粒子を磁気的に分離し、そして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。蛍光ナイル赤カルボキシル磁性粒子を脱イオン水に懸濁させて850mlとし、約11.0%の磁性金属酸化物含量を有し4.4μmの平均サイズを有する5.0%w/v懸濁液を得た。

実施例41

11.28%w/vの2.24μmポリスチレン粒子12.4ml、実施例5の記載に従って調製した2.78%w/vの金属酸化物65ml、1.75mlの脱イオン水及び、6.75mlのステレン中に0.18gの過酸化ベンゾイルと7mgのナイル赤と0.75mlのジビニルベンゼンとを含む溶液を含有する混合物を密封した瓶に加えた。瓶を吸引して約60rpmで60~70℃のオープン中約15時間回転した。混合物を、2層にしたチーズクロスで濾過し、磁気的に分離し、そして上澄が透明になるまで脱イオン水で数回洗浄した。得られた蛍光架橋磁性粒子を脱イオン水に懸濁させて170mlとし、約16.5%w/vの金属酸化物含量を有し4.0μmの平均サイズを有する5.4%w/vの懸濁液を得た。

実施例42

蛍光及び無蛍光カルボキシル磁性粒子（ほぼ同じ金属酸化物含量を有する）へのヤギ抗HBsAgの結合は実施例30と同様であった。

黒の96ウエルのマイクロ滴定板〔Pandex（登録商標）〕のウエルに、4.0μmの、ヤギ抗HBsAgを被覆した蛍光及び無蛍光カルボキシル磁性粒子の完全な混合物（比率1:1）、濃度0.125%w/vの20μlを加えた。磁性粒子を含

24

むウエルに、種々の量のHBsAgを含む無処理血漿又はHBsAg陰性血漿の100μlを加えた。37℃にて30分間インキュベーションした後、粒子を磁気分離機により分離し100μlの洗浄用緩衝液で2回洗浄した。粒子を含む各ウエルに希釈緩衝液中のマウス抗HBsAgとB-ガラタトシダーゼとの結合体20μlを加えた。37℃で15分間のインキュベーションの後、粒子を分離し上記のようにして6回洗浄した。粒子を含むウエルに、4-メチルウンベリフェリル-B-D-ガラクトピラノシド（MUG, Sigma）を含有する溶液50μlを加えた。板を37℃でインキュベートし、蛍光強度を、励起側525nm及び蛍光側580nmのフィルター（チャンネルC、対照チャンネル）を備えた蛍光濃度分析機〔FCA, Pandex（登録商標）〕を用い、8分間隔で25倍利得に設定して測定した。チャンネルCの蛍光強度を任意に定めた蛍光単位（AFU）にて記録し表（1）に示した。結果は、蛍光磁性粒子が空のウエルを検出し、また平均蛍光強度に満たないウエルをも表示していることを示している。これはビペット操作の誤りかアッセイ中の粒子の損失によるものである。

表 (1)

ウエルの数	チャンネルC(対照チャンネル)	
	ΔAFU範囲	ΔAFU範囲
12空	4832-4900	4867
17	29826-33200	31480
1	—	19458*
1	—	27952

*17ウエルの平均AFU 31480に対し1個のウエルのAFUが19458であることは、当該ウエルの粒子の損失又はアッセイ当初に少ない数の粒子しか放出されなかったことを示す。

実施例43

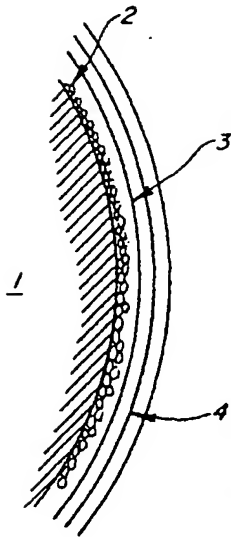
アッセイ能力の比較のためヤギ抗HBsAgで被覆した蛍光及び無蛍光カルボキシル磁性粒子を同時にアッセイにおいて使用した以外は、実施例42の記載と同じ手順に従った。蛍光強度はチャンネルD（定量チャンネル、励起側365nm及び蛍光側450nmフィルター）を用いて測定し、表（2）に示した。結果は、蛍光及び無蛍光の粒子のいずれもアッセイにおいて同等の成績をあげたことを示している。

表 (2)

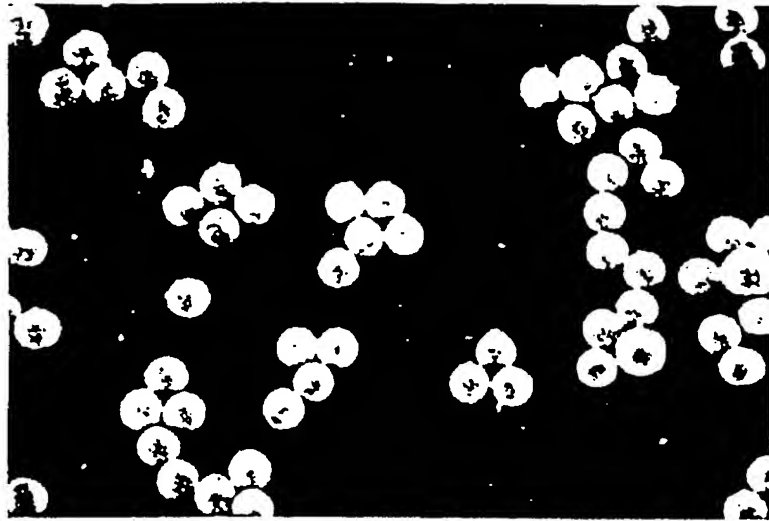
HBsAg濃度	AFU	
	蛍光粒子	無蛍光粒子
高	27238	30059
中等度	5820	5976
低	1688	1816
陰性	326	403

40

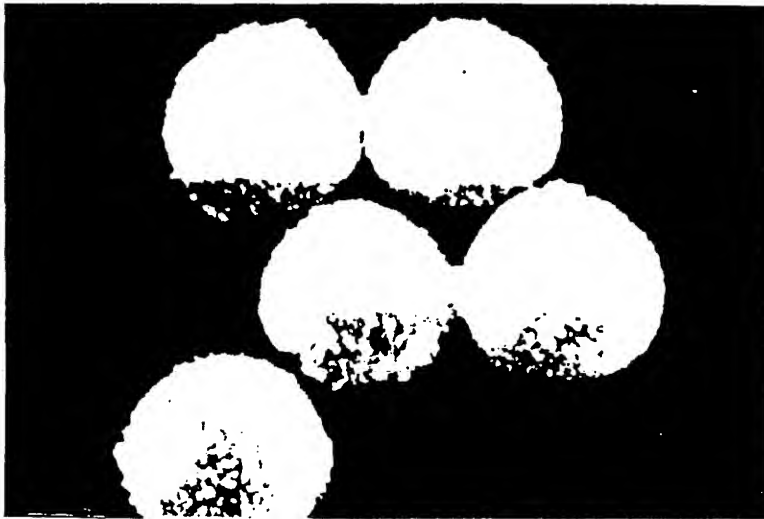
【第1図】



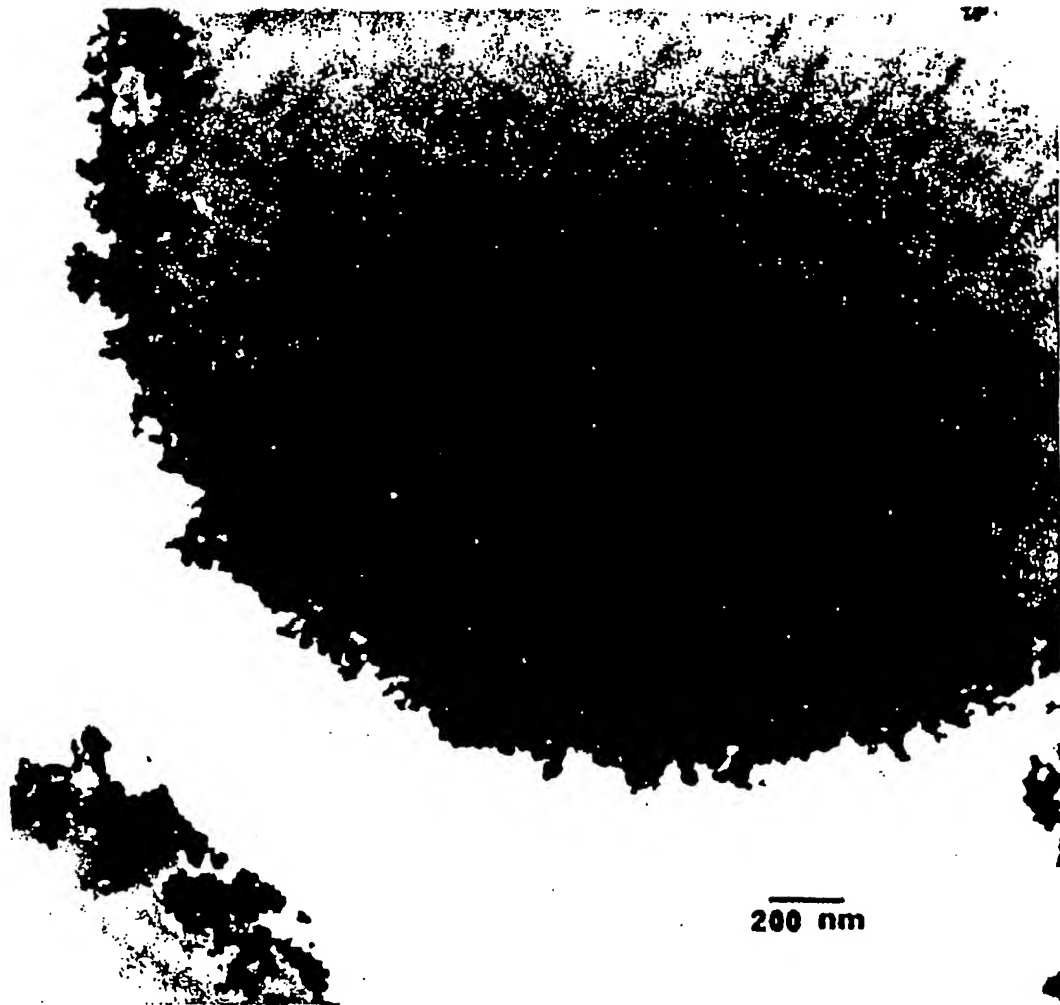
【第3a図】



【第3b図】



〔第2図〕



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 452,099
(32)優先日 1989年12月14日
(33)優先権主張国 米国(US)

(56)参考文献 米国特許4707523(US, A)
米国特許4369226(US, A)
米国特許4206094(US, A)

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**